

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-104597

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)4月17日

C 07 K 13/00

8318-4H

3/12

8318-4H

C 12 P 21/02

ZNA H

8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全4頁)

⑮ 発明の名称 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するペプチドの結晶およびその製造法

⑯ 特 願 昭63-259099

⑰ 出 願 昭63(1988)10月14日

⑱ 発 明 者 横 尾 義 春 神奈川県相模原市横山3-4-17

⑲ 発 明 者 小 西 の ぼ る 東京都町田市成瀬2-16-2

⑳ 発 明 者 山 崎 基 生 東京都町田市本町田815

㉑ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、白血球減少等の治療薬として有用なヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)活性を有するペプチドの結晶およびその製造法に関する。G-CSF活性を有するペプチドの結晶はG-CSFを精製する際に有用である。

〔従来の技術〕

G-CSFは骨髓幹細胞から白血球の一種である顆粒球コロニーを形成させるタンパク質である。生体の造血系を制御する生理活性物質として重要な役割を担っている。

最近のDNA組換え技術の進歩により天然のG-CSFのみならずG-CSF活性をもつ誘導体も報告されている。

一方、タンパク質の結晶化は個々のタンパク質によってその条件が左右され、現在のところ一般化された方法はない。しいてあげれば、塩や有機溶媒を添加することでタンパク質の溶解度をさげる方法がよく用いられる。しかし、それら塩や有

1. 発明の名称

ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するペプチドの結晶およびその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) 組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子(以下G-CSF)活性を有するペプチドの結晶
- (2) 組換え型G-CSF活性を有するペプチドの水を主体とする溶液に水溶性物質を添加して該ペプチドの結晶を析出させることを特徴とする組換え型G-CSF活性を有するペプチドの結晶の製造法。
- (3) 組換え型G-CSF活性を有するペプチドの水を主体とする溶液を透析膜または限外濾過膜を用いて該ペプチドの溶解度以上に濃縮し、そのまま放置して該ペプチドの結晶を析出させることを特徴とする組換え型G-CSF活性を有するペプチドの結晶の製造法。

機溶媒は注射用医薬品添加物として好ましくないものが多く、製剤化のためには結晶を洗浄するなどしてそれら塩や有機溶媒を十分に除去しなければならない。

〔発明が解決しようとする課題〕

ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を失わず、結晶状G-C S F活性を有するペプチド及びその製造法の開発が求められている。

〔課題を解決するための手段〕

本発明によればG-C S F活性を有するペプチドの結晶はG-C S F活性を有するペプチドの水を主体とする溶液に水溶性物質を添加して該ペプチドの結晶を析出させることができる。これは水溶性物質の添加により該ペプチドの溶解度が下がり結果として結晶が析出するためである。(製造法I)

さらにG-C S F活性を有するペプチドの水を主体とする溶液を限外ろ過膜もしくは透析膜を用いて濃縮し放置することによっても目的の結晶を得ることができる。(製造法II)

第1表 G-C S F誘導体(A)の全配列

1	5	10	15																
X	Ala	Pro	Thr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln
20	25	30	35																
Gln	Val	Arg	Iys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Gln	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr
40	45	50	55																
Lys	Leu	Cys	His	Pro	Gly	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala
60	65	70	75																
Pro	Leu	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His
80	85	90	95																
Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Gln	Gly	Ile	Ser	Pro	Gln	Leu
100	105	110	115																
Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln
120	125	130	135																
Gln	Met	Gln	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro	Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala
140	145	150	155																
Phe	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser
160	165	170	174																
Phe	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Pro					

本発明で用いられるG-C S F活性を有するペプチドは組換え型のG-C S F活性を有するペプチドであればいずれも対象となる。

具体的には、第1表に示されるアミノ酸配列を有するもの〔G-C S F誘導体(A)〕(EP-A1-0272703)または第2表に代表されるような、第1表のアミノ酸配列中で少なくとも一個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたポリペプチドまたはN末端アミノ酸が1~11ヶ欠失したポリペプチドでG-C S F活性を有するものが例示される。さらに特開昭63-229、特公表63-500636に記載のヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体も用いることができる。第1表中、Xは水素原子またはメチオニン残基を示す。

第2表

アミノ酸置換の位置	1	3	4	5	17
第1表のアミノ酸	Ala	Thr	Tyr	Arg	Ser
B	*	*	*	*	Cys
C	*	Glu	Lys	Ser	*
D	Val	Ile	Arg	Ser	*
E	Cys	Ile	Arg	Ser	*
F	Tyr	Ile	Arg	Ser	*
G	Arg	Thr	Arg	Ser	*
H	*	Thr	Arg	Ser	*
J	Asn	Glu	Arg	Ser	*
K	Ile	Thr	Arg	Ser	*
L	Ser	Thr	Arg	Ser	*
M	*	*	Arg	*	*

*は第1表と同じであることを示す。

以下製造法Iについて詳細に説明する。

本発明に用いられる水を主体とする溶液としては、種々の塩の溶液が用いられ特にpH5~9に緩衝能力をもつ塩たとえば磷酸塩、酢酸塩、トリ

ス塩酸塩などが好ましく使用される。

該ペプチドの濃度としては、0.1% (W/V) 以上、好ましくは3% (W/V) 以上が良い。

水溶性物質としては、例えば塩類、有機溶媒または高分子化合物があげられる。塩類としては例えば硫酸、食塩、硝酸、塩酸などがあげられる。有機溶媒としては例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、2メチルペンタンジオールなどがあげられる。高分子化合物としては平均分子量約1000ないしは15000のもので例えばポリエチレングリコールがあげられる。

水溶性物質の添加量は塩類で終濃度5~25% (W/V) である。有機溶媒の場合終濃度10~40% (W/V) である。高分子化合物の場合終濃度0.5~30% (W/V) である。

溶液のpHは2~10、好ましくは5~9に保つのが良い。溶液の温度は0~50℃、好ましくは5~15℃が良い。

以下に製造法Ⅱについて詳細に説明する。

水を主体とする溶液としては製造法Ⅰと同様の

溶液が用いられる。

透析膜としてはセルロース系の膜、例えば三光純薬製のものが使用される。限外濾過膜の材質としてはポリスルホン系またはポリオレフィン系のものが使用される。その形状としては平板膜型、スパイラル型、ホローファイバー型またはチューブ型などが使用される。膜透過推進力としては空気または重蒸で加圧、減圧、遠心力を利用するものなどがいずれも使用できる。

この濃縮法の特徴は、タンパク質の溶解度を越えて濃縮する点にある。例えば、G-C S F誘導体(A)のpH7における飽和溶解度は3% (W/V) であるが限外濾過膜濃縮を行うと7~8% (W/V) にまで濃縮することができ過飽和となる。かくして目的物が析出してくる。

以下に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1.

参考例1で得られたG-C S F誘導体(A)の5mMリン酸溶液(pH7.2)を限外濾過膜(商

品名 ウルトラセント-30:東ソー製)で濃縮した結果70mg/mlの濃度であった。これをそのまま5℃で放置すると2日後に結晶が析出した。

実施例2.

参考例2で得られたG-C S F誘導体(B)の5mMリン酸溶液(pH7.2)を透析チューブに詰め低温室(5℃)内で吊るしてそのまま一週間乾燥濃縮した。タンパク質濃度は30mg/mlであった。これに飽和硫酸水を、溶液が白く濁る程度に加えそのまま5℃で一週間放置すると結晶が析出した。第1図にその顕微鏡写真を示す。

実施例3.

2種類のG-C S F誘導体(A)および(B)について、次の実験を行った。それぞれのタンパク質の5mMリン酸溶液(pH6.4)を限外濾過膜(商品名 ウルトラセント-30:東ソー製)で濃縮した。濃度はいずれも60mg/mlであった。これをそのまま5℃で放置し、30日後溶液を偏光顕微鏡で観察していずれにも結晶が認められた。

参考例1.

第1表に示したアミノ酸配列をコードしたDN Aを含むプラスミドpC f B D 2 8を保有する大腸菌W 3 1 1 0 strA(Escherichia coli ECFCB028 FERM BP-1479)をLG培地(バクトトリブトン10g、酵母エキス5g、グルコース1gを水1ℓに溶かし水酸化ナトリウムにてpHを7とする。)で37℃、18時間培養しこの培養液5mlを25mg/mlのトリプトファンと50mg/mlのアンピシリンを含むMCG培地[リン酸二ナトリウム0.8%、リン酸一カリウム0.3%、食塩0.5%、カザミノ酸0.5%、硫酸マグネシウム1mM、ビタミンB₁₂ 4mg/ml、pH7.2]100mlに接種し、30℃で4~8時間培養後、トリプトファンの誘導物質である3β-インドールアクリル酸を10mg/ml加え、さらに2~12時間培養を続けた。培養液を8000rpm、10分間遠心して菌液20mMトリス塩酸緩衝液pH8で洗浄した。洗浄菌体を上記緩衝液に懸濁し、0℃で超音波破砕(BRANSON SONIC POWER社 SONIFIER CELL DISRUPTOR 200、out put control 2.10分間処理)した。こ

れを9000rpm、30分間遠心して固体残渣を得た。この固体残渣を7M尿素により可溶化した。20mMトリス塩酸緩衝液(pH8)に希釈したのち、予め20mMトリス塩酸緩衝液(pH8)で平衡化したDEAEトヨパール(東ソー製)に接触・吸着し、0.1M食塩を含むトリス塩酸緩衝液で溶出した。G-CSF誘導体画分はついで、予め50mMリン酸緩衝液(pH7.2)で平衡化したセファデックスG25に通筒して脱塩した。このときのタンパク質濃度は1.7mg/mlであった。

参考例2.

第2表のBに示すアミノ酸配列をコードするDNAを含むプラスミドpCIBDC28を保有する大腸菌W3110 strainを用い、参考例1と同様にしてG-CSF誘導体(B)を取得した。
[発明の効果]

結晶化によってG-CSF活性を有するペプチドの純度を著しく向上させることができ、またその精製法として応用することができる。さらに、X線解析法によるG-CSFの立体構造を解明す

ることができる。本発明によって結晶化手法が提供される。特に、後工程として除去を必要とする高濃度の塩や有機溶媒を用いずに、そのまま直ちに製剤化可能な結晶化手法が提供された。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、第2表Bに示すペプチドの結晶の顕微鏡写真を示す。

特許出願人 (102) 協和醗酵工業株式会社

代表者 加藤 幹夫



手続補正書(方式)

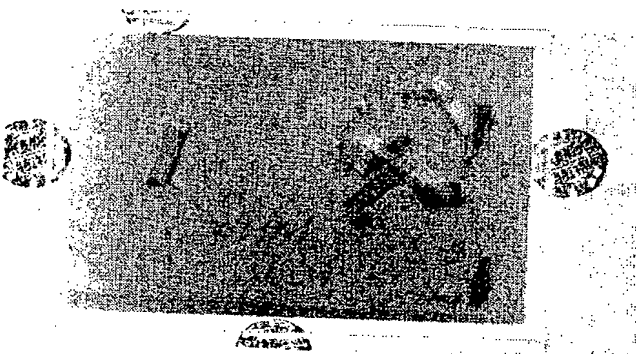
平成 元年 2月16日

特許庁長官殿



図面の浄書

第1図



1. 事件の表示

昭和63年特許願第259099号

2. 発明の名称

ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するペプチドの結晶およびその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名称 (102) 協和醗酵工業株式会社

(TEL:03-282-0036)

代表者 加藤 幹夫



4. 補正命令の日付

昭和64年1月6日(発送日:平成1年1月31日)

5. 補正の対象

図面

6. 補正の内容

別紙のとおり
式 査

